

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219875

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl.
 C12N 15/12
 C07K 13/00
 C12N 1/19
 C12N 15/81
 C12P 21/02
 //(C12N 1/19
 C12R 1:865)
 (C12N 15/81
 C12R 1:645)
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:865)

(21)Application number : 02-015559

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES
INST
KOWA CO

(22)Date of filing : 25.01.1990

(72)Inventor : NAKAO JUNJI
SUGAWARA KEISHIN
MIYATSU YOSHINOBU
HAMADA FUKUSABURO
IWASAKI AKIO
SUDA MAKOTO

(54) PRODUCTION OF CPB-I AND RECOMBINANT PLASMID AND TRANSFORMED YEAST USING THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject plasmid which is a shuttle vector having a gene originated from yeast and a gene originated from E.coli plasmid, containing a specific anticoagulant substance (CPB-1) manifestation gene fragment and capable of producing CPB-1 in high efficiency.

CONSTITUTION: The above recombinant plasmid is constructed of a shuttle vector having the above genes and has a CPB-1 manifestation gene fragment composed of Pho5 promoter, CPB-1-cDNA and GAP-DH terminator. The CPB-1-cDNA has been cloned by the present inventor and the details are disclosed in the specification of Japanese Patent Laid-Open Sho 64-20095. The CPB-1-cDNA is a gene fragment having a size of 1566bp and containing a gene fragment coding a peptide (CPB-1) consisting of 319 amino acids. It has been ascertained that the CPB-1 structure gene coded by the gene fragment codes the amino acid sequence of table 1.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

② 公開特許公報(A) 平3-219875

① Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

③ 公開 平成3年(1991)9月27日

C 12 N 15/12
C 07 K 13/008619-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

④ 発明の名称 CPB-Iの製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

⑤ 特 願 平2-15559

⑥ 出 願 平2(1990)1月25日

⑦ 発 明 者 中 尾 順 二 熊本県熊本市清水町麻生田1795-4
 ⑦ 発 明 者 宮 原 敬 信 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2-142
 ⑦ 発 明 者 宮 津 嘉 信 熊本県熊本市健軍2丁目12-23
 ⑦ 発 明 者 濱 田 福 三 郎 熊本県菊池郡西合志町須屋2679-2
 ⑧ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大産686番地
 ⑧ 出 願 人 興 和 株 式 会 社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
 ⑧ 代 理 人 弁 理 士 有 賀 三 幸 外2名
 最終頁に続く

明 細 書

④ 発明の名称

CPB-Iの製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

⑤ 請求の範囲

酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらにrho5プロモーター、CPB-I-cDNAおよびGAP-DHターミネーターからなるCPB-I発現遺伝子断片を有することを特徴とする組換えプラスミド。

酵母由来の遺伝子が、2μori、arsIおよび形質転換酵母用選択マーカー遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

大腸菌由来の遺伝子が、プラスミドpBR322由来のoriginおよび薬剤耐性遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

請求項(1)記載の組換えプラスミドを酵母に導入することにより得られる形質転換酵母。

宿主酵母が、Saccharomyces cerevisiaeである

請求項(4)記載の形質転換酵母。

(5) 請求項(4)または(5)記載の形質転換酵母を培養し、該培養物よりCPB-Iを採取することの特徴とするCPB-Iの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、ヒト胎盤を始めたとするヒト組織より得られる抗血液凝固物質(カルフォビンゲン、以下CPB-Iと称する)の遺伝子組換えによる製造方法、ならびにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母に関する。

〔従来の技術〕

これまでに、生体関連の抗血液凝固物質として、ヘパリン、ヘパリンコファクター-II、アンチトロンビンIII、α-I-アンチトリプシン等が知られている。これまでのところ、抗血液凝固剤として実用化されたのはヘパリンのみであるが、副作用の問題や、使用方法が限定されていること等から満足のものではなかった。

このような状況の下で、本出願人は、ヒト胎盤

からCPB-I(当初PCIと称していた)を分離精製することに成功し、特許出願した(特開昭62-174023号)。さらに、本出願人は、CPB-Iに対して特異的なモノクローナル抗体を作製し、(特開昭63-123395号)、その後この抗体をプローブとしてヒト胎盤cDNAライブラリーからCPB-Iをコードする遺伝子断片をクローニングし、これを遺伝子組換え技術により大腸菌で発現することに成功した(特開昭64-20095号)。

このようにして大腸菌により発現・精製されたCPB-Iは、胎盤より精製された本来のCPB-Iとほぼ同等の抗血液凝固活性を有することが確認された。しかしながら、この場合に発現の宿主となっている大腸菌は、発熱物質(パイロジェン)を特に多く産生することが知られており、目的のCPB-Iの精製において、このようなパイロジェン等の除去操作が煩雑になることが危惧された。

また、一般に、特定の外来遺伝子を遺伝子組換え技術により発現させる場合は、発現の宿主細胞

として何を用いるか、発現用プロモーターとして何を用いるかによって、目的のペプチドの発現量は大きく変化することが知られている。これまでの様々な遺伝子組換えによる外来遺伝子の発現に関する報告により、一般的に効率のよい発現系というものがあるに明らかにされつつある。しかしながら、目的の外来遺伝子の発現産物が発現の宿主細胞に及ぼす影響等により、通常発現量が高いとされている発現系が、特定の外来遺伝子の発現には好ましい結果を示さないことがあることが判ってきた。これとは逆に、特定の外来遺伝子に対しては非常に相性がよく、極めて高い量の発現が可能となるような発現系が存在することも知られている。

したがって、CPB-Iの工業的生産を目的として研究を進めるうえでは、より効率よくしかも安定にCPB-Iを生産することが可能なCPB-Iの生産に適した発現系を見いだすことが望まれていた。

〔発明の目的〕

このような状況において、本発明者らは、CPB-Iの遺伝子組換えによる製造に関して研究を重ねた結果、酵母を宿主としてしかも特定の発現系を用いることにより、所望する生理活性を有するCPB-Iを極めて効率よくしかも安定に産生する形質転換酵母を得ることに成功し、CPB-Iの効率的な製造方法を見いだして本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の目的は抗血液凝固物質CPB-Iを遺伝子組換え技術を用いて製造する際において、CPB-Iを極めて効率よく産生させるための酵母用組換えプラスミドおよび形質転換酵母ならびにこれを用いたCPB-Iの製造方法を提供することにある。

〔発明の構成および効果〕

かかる目的を達成する本発明組換えプラスミドの構成は、酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらにPho5プロモーター、CPB-I-cDNAおよびGAP-DHターミネーターか

らなるCPB-I発現遺伝子断片を有することを特徴とするものである。

本発明において、遺伝子組換え技術により発現させる遺伝子：CPB-I-cDNAについては本発明者らにより先にクローニングされており、詳細は、特開昭64-20095号公報に記載されている。

このCPB-I-cDNAは、アミノ酸319個からなるペプチド(CPB-I)をコードする遺伝子断片を含む1566bpの遺伝子断片である。これにコードされるCPB-I構造遺伝子は、下記のアミノ酸配列をコードしていることが確認されている。

Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp
Phe Pro Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu
Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr
Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser
Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala
Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu
Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe
Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser

Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala
 Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu
 Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu
 Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu
 Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly
 Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val
 Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala
 Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala
 Glu Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp
 Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile Thr Ile Phe
 Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val
 Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln
 Ile Glu Glu Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly
 Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val Lys
 Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu
 Thr Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr
 Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser
 Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys
 Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr
 Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr

TAT GGC TCA AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG
 GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG CGG ATG TTG GTG
 GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT
 GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT
 CAG GCT TTA TTT CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG
 GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC ACC ATC TTT
 GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG
 TTT GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA
 ATT GAG GAA ACC ATT GAC CGC GAG ACT TCT GGC
 AAT TTA GAG CAA CTA CTT CTT GCT GTT GTG AAA
 TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG
 ACC CTC TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA
 GAT GAT CAT ACC CTC ATC AGA GTC ATG GTT TCC
 AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG AAG
 GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT
 TCC ATG ATT AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT
 AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC TGT GGA GAA GAT
 GAC TAA

これまでに報告されている酵母の発現系で用い
 られたプロモーターとしては、ADH1 (アルコ

Lys Lys Ala Leu u Leu Leu Cys Gly Glu Asp
 Asp

によって、本発明におけるC P B - I 発現プラス
 ミドの構築には、上記のアミノ酸配列をコードす
 る遺伝子断片が使用される。C P B - I をコード
 する遺伝子断片の具体的な塩基配列としては、そ
 の一例として下記の塩基配列からなるDNAを含
 む遺伝子断片が挙げられる。

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC
 TTC CCT GGA TTT GAT GAG CGG GCT GAT GCA GAA
 ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC TTG GGC ACA
 GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC
 CGA AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA
 GCT TTT AAG ACT CTG TTT GGC AGG GAT CTT CTG
 GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA AAA TTT
 GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TTT
 CGG CTT TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC
 TTG AAG GGA GCT GGA ACA AAT GAA AAA GTA CTG
 ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA GAA
 CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA

ールデヒドロゲナーゼ) プロモーター (Hetzenan
 ら、Nature, Vol. 293, p717-722(1981))、
 Pho 5 (抑制性酸性ファクター) プロモ
 ーター (宮之原ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
 Vol. 80, p1-5 (1983))、PGK1 (フェスフォ
 グルコキナーゼ) プロモーター (Hitzman ら、
 Science, Vol. 219, p620-625(1983))、GAP-
 DH (グリセロールデハイドロフェスフェートデ
 ヒドロゲナーゼ) プロモーター (Bitterら、Gene,
 Vol. 32, p264-274 (1983)) 等が挙げられる。こ
 こに挙げた酵母用プロモーターの中では、特
 にGAP-DHプロモーターが、プロモーター活
 性が強く、その結果効率よく外来遺伝子を発現す
 ることが知られている。

本発明に係るC P B - I の発現においては、
 GAP-DHプロモーターを用いた発現系は発現
 量的面ではかなりよい結果が得られたものの、形
 質転換体の継代による発現の安定性という一面に
 おいて問題が残ることが確認された。

そのために、種々のプロモーターとの組み合わせ

により、種々のCPB-1発現系を構築し、得られた形質転換体によるCPB-1の発現量と遺伝子による発現の安定性の両面から検討を進めたところ、前記本発明プラスミドを用いた発現系によりCPB-1を発現させた場合が非常によい結果を示すことが確認された。

すなわち、本発明に係る酵母発現系においては、Pho5プロモーターおよびGAP-DHターミナーを用いることを特徴とし、酵母と大腸菌の遺伝子を有するシャトルベクターが使用される。特に、酵母由来遺伝子として、2 μ oriおよびarsIの2つのorigin並びに選択マーカー遺伝子を用いるのが好ましい。

この酵母用選択マーカー遺伝子としては、種々のアミノ酸を産生する遺伝子、例えばロイシン産生遺伝子、ヒスチジン産生遺伝子、トリプトファン産生遺伝子等が用いられる。このようなアミノ酸産生選択マーカー遺伝子を用いる場合には、形質転換を行う宿主酵母として、該アミノ酸要求性のものを使用する。

より構築される。両遺伝子の結合は、常法により行われるが、合成リンカー等を使用することにより、鋳型の制限酵素認識部位（制限酵素による切口）が異なる2つのDNA断片を結合させることが可能となる。このような合成リンカーは、市販のものを使用することもできるし、目的に応じてDNA合成機により調製することもできる。

このようなCPB-1発現プラスミドを常法により宿主となる酵母菌に導入することにより、本発明のCPB-1発現形質転換酵母が得られる。代表的な酵母の形質転換方法としては、酵母をプロトプラスト化してプラスミドを導入する方法〔Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, p1929(1978)〕、アルカリ金属による酵母の形質転換方法〔木村ら、J. Bacteriol., Vol. 153, p163(1983)〕等が挙げられる。

宿主酵母の代表例としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 [a lou2 his4 Can1]（微生物研究第312号）等が挙げられる。宿主酵母は、発現用プラスミドに用いた酵母選択マーカー遺伝

子一方、酵母由来遺伝子としては、大腸菌内でのプラスミドの自律増殖を可能にするoriginおよび大腸菌内で機能する選択マーカー遺伝子が用いられる。この大腸菌用選択マーカーとしては、種々の薬剤耐性遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が使用される。このようなoriginと薬剤耐性遺伝子の双方を有する大腸菌由来遺伝子断片として、例えば大腸菌プラスミドpBR322由来の遺伝子断片を使用することが可能である。

このような外来遺伝子発現用シャトルベクターの一例として、第2図に示すシャトルベクターpPS1が挙げられる。このシャトルベクターはPho5プロモーターとGAPターミナーの間に、外来遺伝子の組み込み部位として、IhoIおよびBamHI部位を有する。

本発明のCPB-1発現プラスミドは、このようなシャトルベクターの外来遺伝子用形質転換部位にCPB-1-cDNAを組み込むことに

適したものが使用される。また、通常の宿主酵母では、Pho5プロモーターはリン酸の存在下においてプロモーター活性が抑制されることから、リン酸存在下においても、Pho5プロモーター活性を抑制しないように改良された酵母宿主細胞を使用することも可能である。そのような酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 pho80（微生物研究第509号）が挙げられる。このような改良株を用いれば、リン酸の存在下においてもPho5プロモーターは機能が抑制されず、CPB-1を発現させることが可能となる。

通常の酵母宿主、すなわちリン酸存在下においてはPho5プロモーターの機能を抑制する酵母を用いた形質転換体では、最初にリン酸を含む培地で酵母を対数増殖期まで増殖した後、これを適心により菌濃として、次にリン酸を含まない培地で培養することにより、所望の菌体を数まで増殖した酵母にPho5プロモーターを機能させる。CPB-1を一挙に発現させることができる。

また、培地としては、酵母の選択マーカーが活

かされる増地を使用する。例えば、上記の *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (a leu2 his4 can1) を用いた場合には、宿主酵母菌がロイシンヒスチジン要求株であり、そのいずれかのアミノ酸が組換えプラスミドにより補充される場合には、もう片方の欠損するアミノ酸を含む合成増地、例えばバルクホルダー最小増地(東江ら、J. Bacteriol., 113, p727-738、P.R. Burkholder, Am. J. Bot., 30, p206(1943))が使用される。

単位増地当りの菌体数を増加させて、CPB-Iの発現量を向上させるためには、上記のような選択性合成増地の代わりに、半合成増地と呼ばれる酵母エキスを含有栄養分の高い増地を使用することができる。通常、このような非選択性の増地を用いると菌体数は増加するものの、プラスミドを脱落させた酵母菌も増殖し、結果的に発現量は低下することが多いが、本発明の形質転換体では、そのような現象は確認されず、非選択性の増地においても選択性増地の場合と同等の発現量を示す。大量培養の際には、段階的な培養により酵母菌

数を増殖させる。まず数リットルの規模で選択性の増地を用いて培養し、次にこれを栄養豊富な半合成増地により数十～数百リットルの規模で培養することができる。

このようなCPB-Iの製造方法によれば、酵母菌体破砕液中に含まれる最も多い蛋白質としてCPB-Iを発現させることが出来、後の精製においても極めて効率的に目的のCPB-Iを精製することが可能となる。

CPB-Iの精製方法としては、通常の精製手段を応用することにより、きわめて効率よくCPB-Iを精製することができる。

このようにして得られた酵母由来CPB-Iのアミノ末端の解析を行ったところ、胎盤から精製されたCPB-Iと同様、アミノ末端がアセチル化を受けていることが確認された。このことから、本発明方法により製造されたCPB-Iの生理活性が天然のものに比較して何等劣るものではないことが推測される。

本発明は、このような性的に優れたCPB-I

を、形質転換酵母により極めて大量に発現させることを可能にするものであり、特に工業的レベルでのCPB-Iの製造において、きわめて優れた技術を提供するものである。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例

Ⅰ CPB-I遺伝子の調製

ヒト胎盤cDNAライブラリーより、フージを用いたクローニングを行い、抗CPB-Iマウスモノクローナル抗体を用いて発現産物のスクリーニングを行った。その結果、1566bpにわたるほぼ完全長のcDNAを得ることができ、この遺伝子断片には、アミノ酸319個からなるCPB-Iをコードする遺伝子を含むことが確認された(第1図参照)。CPB-IのcDNAのクローニングに関しては、特開昭64-20095号公報にさらに詳細に記載されている。

Ⅱ 酵母菌シャトルベクターpPSIの調製

外来遺伝子発現用のプロモーターとして酸性フ

ォスファターゼ(Pho5)のプロモーターを有する酵母一大腸菌シャトルベクターpAM82(特開昭59-36699号)を、制限酵素XhoIおよびPvuIIで処理し、これを2%アガロースゲル電気泳動に処することにより、Pho5プロモーター他を含む約9.8kbpの遺伝子断片を得た。

一方、GAP-DH遺伝子のHindIII断片(J. Biol. Chem., Vol.255, No.6, p2596-2605(1980))をpBR322のHindIII部位に組み込んだプラスミドpBR-GAPを、制限酵素SalIおよびEcoRVで処理し、GAPターミネーターを含む遺伝子断片(SalI-EcoRVフラグメント)を得た。この遺伝子断片をクローニングベクターpUC19のSalI-SmaI部位に組み込み、GAPターミネーターを有するプラスミドpUC-GAPterとした。このプラスミドを制限酵素SalIで処理して開裂させた後、DNAポリマーゼ(クレンウフラグメント)により切口をフイルインし、これにSamHIリンカーを導入して再度環状化した。次にこのプラスミドを制限酵素

PstIで処理し、上記 様にDNAポリメラーゼで反応させた後、XhoIリンカーを導入した。これによりGAPターミネーターのすぐ上流にBamHI部位とXhoI部位が導入されたプラスミドpUC-GAP-ter(BamHI, XhoI)を得た。このプラスミドを制限酵素RsaIで処理し、アガロース電気泳動によりGAPターミネーターを含む約1.4kbpの遺伝子断片を得た。これをさらに制限酵素XhoIで処理した後、上記と同様の操作を行い、GAPターミネーターを含むRsaI-XhoIフラグメントを得た。

この遺伝子と上記で調製したpAM82由来のXhoI-PvuIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼを用いて結合させることにより、酵母一大腸菌シャトルベクターpPSIを得た。このシャトルベクターは、外来遺伝子用の発現調節遺伝子としてPho5プロモーターおよびGAPターミネーターを有し、さらに酵母一大腸菌シャトルベクターとして機能するために、酵母由来遺伝子としてarsI、2 μ oriおよびロイシン産生遺伝子

することにより、第3図にリンカーAとして示す合成リンカーを得た。このリンカーは、制限酵素XhoIとNcoIで切断された切口の異なる2つのDNA断片を結合させるものであり、リンカー全体としての塩基配列は、Pho5プロモーターの機能低下を防ぐべく、本来Pho5プロモーターのリーディング配列のDNA配列と極めて近い配列になるようにデザインされている。

さらにDNA3とDNA4を混合してアニーリングすることにより、第3図にリンカーBとして示す合成リンカーを得た。この合成リンカーは、制限酵素SacIとBamHIで切断された2つのDNA断片を結合させるものであり、その途中のDNA配列には制限酵素HindIIIおよびXhoIの制限酵素認識配列を有する。

CPB-I-cDNA NcoI-SacI遺伝子断片、合成リンカーA、合成リンカーBおよびシャトルベクターpPSIを、制限酵素XhoIおよびBamHIで処理することにより得られた4種の遺伝子断片を混合し、T4 DNAリガーゼにて反応さ

(Leu2)を 腸菌由来の遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子およびpBR322のoriginを有する外来遺伝子高発現用ベクターである(第2図参照)。

(3) CPB-I発現プラスミドの構築

上記(1)で得られたCPB-I-cDNAを制限酵素NcoIおよびSacIで処理し、CPB-Iの全構造遺伝子を含むNcoI-SacI断片を得た(第4図参照)。

このCPB-I-cDNA NcoI-SacI断片を上記シャトルベクターpPSIのXhoI-BamHI部位に組み込むために、第3図に示した2種の異なる合成リンカーを下記の通り作製した。DNA合成機(アプライドバイオシステムズ381A)を用いて下記の4種のDNAを合成した。

DNA1: TCGAGTAGAGCAAGCAAAATTCGAGATTACC

DNA2: CATCTCGTTCGTTTAAAGCTCTAATGGGTAC

DNA3: AAGCTTCTCGAG

DNA4: TCGATTGCAAGAGAGCTCTAG

上記DNA1とDNA2を混合しアニーリング

せた。

この反応液を、フェノール処理、エタノールに濃縮させたのち、これを用いて大腸菌HB101コンピテント細胞の形質転換を行った。得られた形質転換クロンのプラスミドDNAを回収し、適当な制限酵素で処理して、アガロースゲル電気泳動からの切断パターンを分析することにより、シャトルベクターpPSIのXhoI、BamHI部位にCPB-I-cDNA NcoI-SacI断片が組み込まれた所望のCPB-I発現プラスミドpAPCPB-I(第4図参照)を持つ大腸菌クローンを得た。このクローンから常法に従いプラスミドpAPCPB-Iを調製した。

(4) CPB-Iを発現する形質転換酵母の調製

宿主酵母としてサッカロマイセス・セレビシスAH22 Pho80(微生物学第508号)を用い、これをYPD培地(2%ポリペプトン、1%イーストエキス、2%グルコース)100mlに接種し、30℃で5-7 \times 10⁸まで培養した後、遠心して菌體を洗浄した後、1mlのリチウム溶液に懸濁

30℃で1時間振とうし、その10分の1量(100 μ l)に約2 μ gの組換えDNA(プラス pAPCPB-1)を加えて30℃で30分振とうした。これに0.7mlのポリエチレングリコール溶液を加え、30℃で90分静置した。12℃で5分間熱処理後、滅菌水で2回洗浄した。0.1mlの最小培地(0.7%イースト窒素ペー、2%グルコース、20 μ g/mlヒスチジン、2%窒素)に細胞を懸濁させ、最小培地プレートに塗布した。30℃で培養してロイシン非依存性のコロニーを得た。このコロニーを20 μ g/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマ培地に培養し、形質転換酵母サッカロマイセス・レビスエパAPCPB-1を得た。

酵母によるCPB-1の発現

上記形質転換酵母を30℃で3日間振とう培養し、遠心(3500 rpm、5分間)により酵母菌体を集めた後、1/10培養液量の溶菌液(25mM DTT-25mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4))に懸濁し、ガラスビーズを加えミキシングすることにより酵

母を洗浄した後、OPD溶液を酵素基質溶液として100 μ lずつ添加する。所時にて25℃30分間反応させた後、4.5M H₂SO₄を50 μ lずつ添加し、キナーで混合して反応を停止させる。これを492nmの吸光度を測定し、CPB-1標準品の吸光度から検量線を求め、各検体のCPB-1量を定量する。

その結果、1 μ lの酵母培養液から約150 ngのCPB-1が得られていることが確認された。また、この結果と酵母破砕液中の総可溶性蛋白質を測定した結果とから、本発明においては総可溶性蛋白質のうち約40%もの割合でCPB-1を得ることが可能であることが判明した。

次に、この酵母破砕液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。すなわち、10%ポリアクリルアミドゲルにより検体を電気泳動し、これをコマーシブルリアントブルー(CBB)にて染色した。その結果、他の酵母由来の蛋白質のバンドと比較して、きわめて大量であることを示すCPB-1(分子量約34,000)の

母に物理的衝撃を加えて酵母菌を破砕した。これを遠心して、ガラスビーズおよび酵母破砕断片を除去し、遠心上清を得た。

この上清について、抗CPB-1モノクローナル抗体を用いたELISAによりCPB-1の活性を測定した。このELISAは、下記の操作からなる。

まず、ポリスチレン製96穴ELISA用マイクロプレートに、一次抗体として抗CPB-1マウスモノクローナル抗体をコーティング用緩衝液[0.05M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)]で10 μ g/mlに希釈し、各ウェルに100 μ lずつ注入する。25℃で2時間静置し、PBS-Tween(PBS 1 μ lに対してTween20を0.5 μ l溶解する)で洗浄した後、各ウェルにCPB-1標準溶液および検体を100 μ lずつ注入し、25℃一夜反応させる。その後PBS-Tweenにて洗浄した後、西洋ワサビ・パーオキシダーゼ標識Fab'抗CPB-1抗体をPBS-Tweenで希釈して各ウェルに100 μ lずつ注入し、25℃2時間以上反応させる。3回

バンドが確認された。その結果の模式図を第5図に示す。

(6)工業的規模の大量培養によるCPB-1の生産

前記(4)で得られた形質転換酵母を、最小培地にて30℃、2 μ lのスケールで培養した。次いでこれを30 μ lの最小培地に接種し、30℃で71時間培養した。これを170 μ lの半合成培地(培地1 μ l中にシロ糖40g、酵母エキス5g、硫酸アンモニウム5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、消泡剤としてポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル0.025ml)にて30℃、2.4時間培養した。最終培養後の酵母菌体に存在するCPB-1の量を前記ELISAにて測定したところ、選択能力のない半合成培地においても、選択合成培地(最小培地)での発現量と同等のCPB-1の存在を確認した。

このことは、本形質転換が能代培養においてもきわめて発現の安定性がよいことを示している。さらに、発現量についても前記(4)の小スケールでの発現実験において得られた発現量と同等のレ

ベルでCPB-Iの発酵を維持されていることが確認された。

(7) CPB-Iの大量精製

上記で大量培養した培養液より0.1 μ mのメンブランフィルターを用いて粗抽出酵母菌を濾過し、フレンチプレス型細胞破砕機により物理的剝離を加えて酵母菌を破砕した。その後、濾過を行い、得られた粗抽出液を限外濾過器により濃縮した。これに酢酸を加えて等電点沈殿(pH4.5)を行った後、生成した沈殿物を遠心により除去し、上清をアンモニアによりpHを7.0に調整し、次いでQAE-トヨパール550C(トソー社製)を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。すなわち、7.0mM塩化ナトリウムを含む1.0mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したカラムに粗抽出液をアプライし、同緩衝液で洗浄後、300mM塩化ナトリウムを含む1.0mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出した。得られたCPB-Iを含む画分を限外濾過器により濃縮した後、1.0mM塩化ナトリウムを含む1.0mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化し

たTSKG3000カラム(トソー社製)によりゲル濾過を行った。その後CPB-Iを含む画分を、pH7.4で平衡化したQAE-トヨパール550Cにアプライし、洗浄後、7.0mMより300mMまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出し、精製CPB-Iを得た。

(例) 酵母により産生されたCPB-Iの物性

(A) N末端アミノ酸配列分析

酵母由来CPB-I 5.6mgを、6M Guanidiniumを含む0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.2)に溶解し、ジチオスレイトール5mgを加え、室温で30分間反応させた後、ヨード酢酸5.0mgを加え室温で30分間反応させてS-カルボキシメチル-CPB-Iを得た。

これを2M尿素を含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、トリプシン100 μ gを加えて37 $^{\circ}$ Cで24時間消化させた後、逆相クロマトグラフィーによりペプチドの分離を行った。

クロマトカラムとしてコスモシル5 C₁₈

300オングストローム(直径1.0mm \times 長さ250mm, 半井化学社製)を用い、溶離液として0.1%トリフルオロ酢酸溶液及び0.1%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル溶液を用いて直線濃度勾配により流速1 μ l/分で溶出した。

検出は214nmの紫外吸収により行った。得られた各ペプチドについてピコグラフィー分析装置(ミリボアリミテッド社製)によりアミノ酸組成分析を行い、N末端ペプチドを含む画分を同定した。このN末端ペプチドは、アルギニンとグルタミン酸、アラニン、バリン、ロイシンの5個のアミノ酸から構成されていることを確認した。

次いでアミノ酸配列解析を行った結果、N末端アミノ基はブロックされていた。更に、FAB-MS分析装置(日本電子社製JMS-0300)により分析した結果、分子量は627であった。

以上の結果からN末端はアセチル化されており、以下の配列を有すると判断した。

Acetyl-Ala-Gln-Val-Leu-Arg

(B) 胎盤抽出CPB-Iとの抗血液凝固活性の比

較

本発明酵母由来CPB-Iとヒト胎盤由来CPB-Iの抗血液凝固活性を比較した。すなわち、0.5mg/mlのPT試薬(リオプラステン、持田製薬社製)100 μ lおよび各種濃度の試料100 μ lを混合し、3分後に生理食塩水で2倍に希釈した標準液200 μ lを添加し血液凝固時間を測定した。

酵母由来CPB-Iとヒト胎盤由来CPB-Iの抗血液凝固作用を比較した表1から判るように本発明酵母由来CPB-Iとヒト胎盤由来CPB-Iとは、ほぼ同じ血液凝固時間(PT)の延長効果を示した。

以下余白

表 1

添加試料 (陽/反応液)	血液凝固時間(秒)	
	酵母由来 CPB-I	ヒト胎盤由来 CPB-I
0	28	29
1	88	79
2	125	119
5	170	165
7	191	192

図面の簡単な説明

第1図は、先に出版人よりクロニングされたCPB-I cDNAの全塩基配列を示す図である。翻訳開始コドンATGのAを1番目として番号を付した。

第2図は、本発明に用いたシャトルベクターpPS1の構造を示す図である。

第3図は、プラスミドpAPCPB-Iの構築の際に使用した合成リンカーの構造を示す図である。

第4図は、本発明のCPB-I発現プラスミドpAPCPB-Iの構造を示す図である。

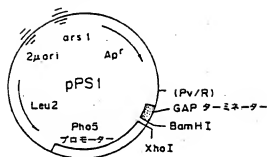
第5図は、本発明の形質転換体によるCPB-I

Iの発現を示す、破砕液のポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示す模式図である。レーン1は分子量マーカーで、上から200K、97K、68K、43K、29K、18.4K、14.3Kダルトンを示す。レーン2～4は、本発明のCPB-I産生形質転換体破砕液の泳動パターンである。レーン5は、本発明のプラスミドを有さない宿主酵母菌の破砕液の泳動パターンである(陰性対照)。

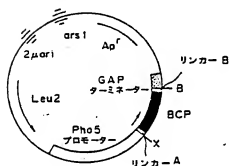
以上

1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
2224
2225
2226
2227
2228
2229
2230
2231
2232
2233
2234
2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248
2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286
2287
2288
2289
2290
2291
2292
2293
2294
2295
2296
2297
2298
2299
2300
2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349
2350
2351
2352
2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400
2401
2402
2403
2404
2405
2406
2407
2408
2409
2410
2411
2412
2413
2414
2415
2416
2417
2418
2419
2420
2421
2422
2423
2424
2425
2426
2427
2428
2429
2430
2431
2432
2433
2434
2435
2436
2437
2438
2439
2440
2441
2442
2443
2444
2445
2446
2447
2448
2449
2450
2451
2452
2453
2454
2455
2456
2457
2458
2459
2460
2461
2462
2463
2464
2465
2466
2467
2468
2469
2470
2471
2472
2473
2474
2475
2476
2477
2478
2479
2480
2481
2482
2483
2484
2485
2486
2487
2488
2489
2490
2491
2492
2493
2494
2495
2496
2497
2498
2499
2500
2501
2502
2503
2504
2505
2506
2507
2508
2509
2510
2511
2512
2513
2514
2515
2516
2517
2518
2519
2520
2521
2522
2523
2524
2525
2526
2527
2528
2529
2530
2531
2532
2533
2534
2535
2536
2537
2538
2539
2540
2541
2542
2543
2544
2545
2546
2547
2548
2549
2550
2551
2552
2553
2554
2555
2556
2557
2558
2559
2560
2561
2562
2563
2564
2565
2566
2567
2568
2569
2570
2571
2572
2573
2574
2575
2576
2577
2578
2579
2580
2581
2582
2583
2584
2585
2586
2587
2588
2589
2590
2591
2592
2593
2594
2595
2596
2597
2598
2599
2600
2601
2602
2603
2604
2605
2606
2607
2608
2609
2610
2611
2612
2613
2614
2615
2616
2617
2618
2619
2620
2621
2622
2623
2624
2625
2626
2627
2628
2629
2630
2631
2632
2633
2634
2635
2636
2637
2638
2639
2640
2641
2642
2643
2644
2645
2646
2647
2648
2649
2650
2651
2652
2653
2654
2655
2656
2657
2658
2659
2660
2661
2662
2663
2664
2665
2666
2667
2668
2669
2670
2671
2672
2673
2674
2675
2676
2677
2678
2679
2680
2681
2682
2683
2684
2685
2686
2687
2688
2689
2690
2691
2692
2693
2694
2695
2696
2697
2698
2699
2700
2701
2702
2703
2704
2705
2706
2707
2708
2709
2710
2711
2712
2713
2714
2715
2716
2717
2718
2719
2720
2721
2722
2723
2724
2725
2726
2727
2728
2729
2730
2731
2732
2733
2734
2735
2736
2737
2738
2739
2740
2741
2742
2743
2744
2745
2746
2747
2748
2749
2750
2751
2752
2753
2754
2755
2756
2757
2758
2759
2760
2761
2762
2763
2764
2765
2766
2767
2768
2769
2770
2771
2772
2773
2774
2775
2776
2777
2778
2779
2780
2781
2782
2783
2784
2785
2786
2787
2788
2789
2790
2791
2792
2793
2794
2795
2796
2797
2798
2799
2800
2801
2802
2803
2804
2805
2806
2807
2808
2809
2810
2811
2812
2813
2814
2815
2816
2817
2818
2819
2820
2821
2822
2823
2824
2825
2826
2827
2828
2829
2830
2831
2832
2833
2834
2835
2836
2837
2838
2839
2840
2841
2842
2843
2844
2845
2846
2847
2848
2849
2850
2851
2852
2853
2854
2855
2856
2857
2858
2859
2860
2861
2862
2863
2864
2865
2866
2867
2868
2869
2870
2871
2872
2873
2874
2875
2876
2877
2878
2879
2880
2881
2882
2883
2884
2885
2886
2887
2888
2889
2890
2891
2892
2893
2894
2895
2896
2897
2898
2899
2900
2901
2902
2903
2904
2905
2906
2907
2908
2909
2910
2911
2912
2913
2914
2915
2916
2917
2918
2919
2920
2921
2922
2923
2924
2925
2926
2927
2928
2929
2930
2931
2932
2933
2934
2935
2936
2937
2938
2939
2940
2941
2942
2943
2944
2945
2946
2947
2948
2949
2950
2951
2952
2953
2954
2955
2956
2957
2958
2959
2960
2961
2962
2963
2964
2965
2966
2967
2968
2969
2970
2971
2972
2973
2974
2975
2976
2977
2978
2979
2980
2981
2982
2983
2984
2985
2986
2987
2988
2989
2990
2991
2992
2993
2994
2995
2996
2997
2998
2999
3000
3001
3002
3003
3004
3005
3006
3007
3008
3009
3010
3011
3012
3013
3014
3015
3016
3017
3018
3019
3020
3021
3022
3023
3024
3025
3026
3027
3028
3029
3030
3031
3032
3033
3034
3035
3036
3037
3038
3039
3040
3041
3042
3043
3044
3045
3046
3047
3048
3049
3050
3051
3052
3053
3054
3055
3056
3057
3058
3059
3060
3061
3062
3063
3064
3065
3066
3067
3068
3069
3070
3071
3072
3073
3074
3075
3076
3077
3078
3079
3080
3081
3082
3083
3084
3085
3086
3087
3088
3089
3090
3091
3092
3093
3094
3095
3096
3097
3098
3099
3100
3101
3102
3103
3104
3105
3106
3107
3108
3109
3110
3111
3112
3113
3114
3115
3116
3117
3118
3119
3120
3121
3122
3123
3124
3125
3126
3127
3128
3129
3130
3131
3132
3133
3134
3135
3136
3137
3138
3139
3140
3141
3

第 2 図



第 3 図



第 4 図

リンカー A

TCGAGTAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACC
 CATCTCGTTTCGTTTAAGCTCTAATGGGTT

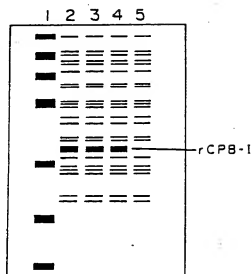
XhoI Pho5 leader

リンカー B

XhoI
 AAGCTTCTCGAG
 TCGATTTCGAAGAGCTCTAG

SacI HindIII BamHI

第 5 図



第1頁の続き

⑨Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 1/19

9050-4B

C 12 P 15/81

ZNA C

8214-4B

C 12 R 21/02

C 12 N 1/19

C 12 R 1:865

C 12 N 15/81

8515-4B

C 12 R 1:645

C 12 P 21/02

C 12 R 1:865

発 明 者 岩 崎 昭 夫

千葉県松戸市常盤平1-14-1 長谷川レジデンス302号

発 明 者 須 田 誠

東京都東村山市野口町2-17-43 興和東村山荘206号

手 続 補 正 書 (自発)

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

平成2年12月4日

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第7頁、第2行

「Thy」とあるを「Thr」と訂正する。

特許庁長官 権 益 敬 啟

送

1. 事件の表示

平成2年特許願第15559号

2. 発明の名称

CPB-Iの製造方法及びこれに用いる組換えプラスミドおよび

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 財団法人 化学及血清療法研究所

名 称 興 和 株 式 会 社

4. 代理人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(669)0904(代)

氏 名 (6870) 赤 土 有 賀 三 幸

住 所 同 上

氏 名 (7756) 赤 土 高 野 登 志 雄

住 所 同 上

氏 名 (9673) 赤 土 中 嶋 俊 夫

補正命令の日付

自 発